

Würzburg, 1959
Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. Dr. W. Neumann

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN TOXIZITÄT VON ISOMEREN
TRIKRESYLPHOSPHATEN UND HEMMUNG DER
CHOLINESTERASEN IM NERVENSYSTEM

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

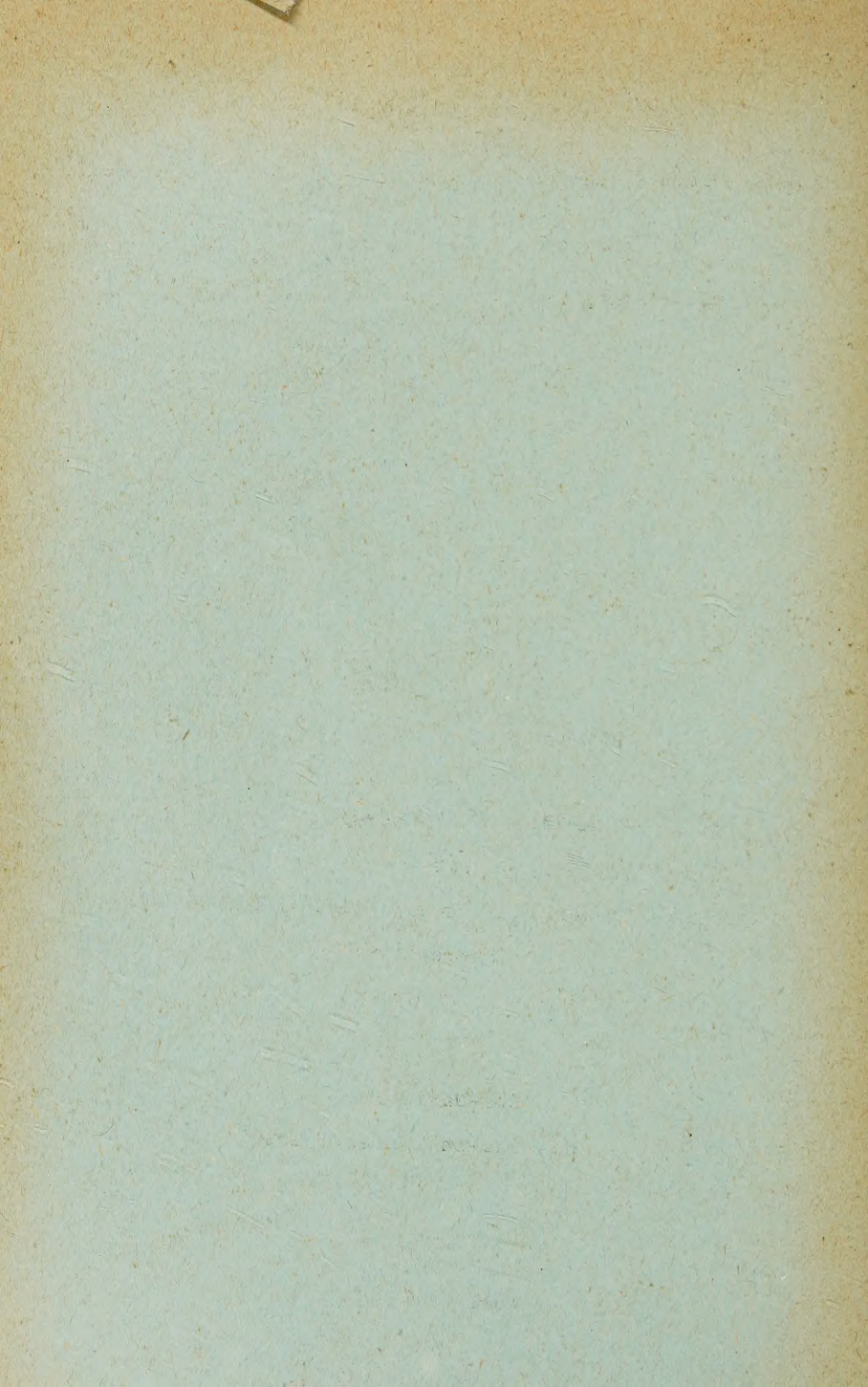
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

LANE LIBRARY. STANFORD UNIVERSITY

Eva-Maria Erb

aus Bad-Salzungen/Thür.

Würzburg 1959



Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. Dr. W. N e u m a n n

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN TOXIZITÄT VON ISOMEREN
TRIKRESYLPHOSPHATEN UND HEMMUNG DER
CHOLINESTERASEN IM NERVENSYSTEM

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Eva-Maria Erb
aus Bad-Salzungen/Thür.

Würzburg 1959

Referent: Privatdozent Dr. D. H e n s c h l e r

Korreferent: Professor Dr. Dr. W. N e u m a n n

Tag der Promotion: **22. 7. 59**

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. Einleitung	1
B. Problemstellung	3
C. Trikresylphosphatmischester und Pseudo- cholinesterasen im Nervensystem des Huhns	5
1. Methodik	6
a) Versuchstiere	6
b) Versuchsprogramm	7
c) Bestimmung der Fermentaktivität	8
d) Geprüfte Phosphorsäureester	8
2. Ergebnisse	10
D. Diskussion	19
E. Zusammenfassung	23
F. Literaturverzeichnis	I



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Trikresylphosphat hat seit der Jahrhundertwende zahlreiche Gruppen- und Massenvergiftungen verursacht. Der ölähnliche Giftstoff geriet wiederholt in alkoholische Getränke, in Apioipräparate, in Speiseöle und andere Nahrungsmittel. In fettknappen Zeiten ist er auch als Ölersatz benutzt worden. Schliesslich hat die Verwendung als Weichmacher in plastischen Kunststoffen mehrfach Anlass zu Vergiftungen gegeben. Diesen mannigfachen Vergiftungsmöglichkeiten entspricht eine umfangreiche toxikologische Kasuistik, die kürzlich von HENSCHLER (1958) sowie BAYER (1958) zusammenfassend dargestellt wurde.

Im Vordergrund des Vergiftungsbildes stehen persistente Lähmungen der unteren und oberen Extremitäten, bedingt durch eine Entmarkung vorwiegend der langen motorischen Fasern im peripheren Nervensystem und bestimmten Bahnen des Rückenmarks. Der Mechanismus dieser chemischen Demyelinisierung ist noch nicht aufgeklärt, obwohl es nicht an einschlägigen Untersuchungen und Deutungsversuchen fehlt.

Die erste wichtige Feststellung im Rahmen dieser Arbeiten stammt von BLOCH (1941, 1942) und BLOCH u. HOTTINGER (1943), die eine beträchtliche Hemmung der Cholinesterase im Serum mehrerer Tierarten nach Verabfolgung von Triorthokresylphosphat fanden. Die hierauf gegründete Hypothese, Triorthokresylphosphat greife an den myoneuralen Synapsen an und führe durch Hemmung des acetylcholin spaltenden Ferments zur Lähmung, war jedoch nicht haltbar, denn wenige Jahre später konnten MENDEL u. RUDNEY (1944) zwei Typen von Cholinesterasen diffe-

renzieren: die sogenannte echte Cholinesterase, die vornehmlich Acetylcholin spaltet, und die sogenannte Pseudocholinesterase, die bevorzugt andere Karbonsäureester spaltet; nur Pseudocholinesterase wird durch Triorthokresylphosphat gehemmt. MENDEL u. MYERS (1952) fanden auch die Pseudocholinesterase im Gehirn von Ratten nach hohen Dosen Triorthokresylphosphat vollständig gehemmt, ohne dass Lähmungen eintraten.

EARL u. THOMPSON (1952) untersuchten dann das Verhalten der Pseudocholinesterase bei Triorthokresylphosphatvergiftung des Huhns, einer Tierart, die regelmässig nach Aufnahme der giftigen Verbindung an ähnlichen Lähmungen erkrankt, wie sie für die menschliche Vergiftung bekannt sind. Das Ferment wird nach lähmenden Dosen fast vollständig gehemmt, die Aktivität kehrt erst im Verlaufe von etwa zehn Tagen langsam zur Norm zurück. EARL u. THOMPSON (1952) diskutierten daher die Möglichkeit, dass die Pseudocholinesterase eine integrierende Rolle im Stoffwechsel des Myelins spiele und dass die zeitweilige Ausschaltung der Fermentfunktion durch den Phosphorsäureester zur Demyelinisierung führe.

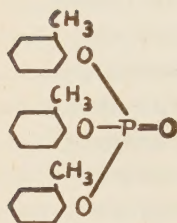
Etwa zur gleichen Zeit erkrankten in England einige Personen beim gewerblichen Umgang mit einem Alkylphosphat, Mipafox (Bis-mono-isopropylamino-fluorophosphinoxid), an Lähmungen, die mit denen bei Triorthokresylphosphatvergiftung identisch waren. Die Tatsache, dass ein von Triorthokresylphosphat chemisch und vor allem physiko-chemisch so verschiedener Phosphorsäureester die gleichen Vergiftungserscheinungen auslösen kann, veranlasste BARNES u. DENZ (1953), eine Anzahl von Vertretern dieser Verbindungsgruppe, die als Insektenbekämpfungsmittel ausgedehnteste Verwendung finden, an Hühnern auf Lähmungswirkung zu prüfen. Ausser Triorthokresylphosphat besaßen diese besondere Wirkung noch

DFP (Di-isopropyl-fluorophosphat) und Mipafox (Bis-mono-isopropylamino-fluorophosphinoxid), nicht aber E 600 (Paraaxon = Diäthyl-p-nitrophenyl-phosphat), Isopropylparathion (Di-isopropyl-p-nitrophenyl-thiophosphat), Methylparathion (Dimethyl-p-nitrophenyl-thiophosphat), E 605 (Parathion = Diäthyl-p-nitrophenyl-thiophosphat), TIPP (Tetra-isopropyl-pyrophosphat) und Tetra-isopropyl-pyrophosphoramid.

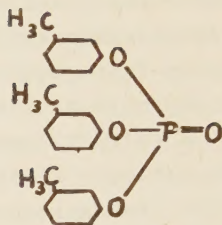
Da aber praktisch alle diese Phosphorsäure-ester die Pseudocholinesterase des Zentralnervensystems hemmen, kann diese Wirkung nicht Ursache oder Hauptursache der Lähmung und Entmarkung sein. DAVISON (1953) sowie AUSTIN u. DAVIES (1954) brachten weitere Stützen für diese Auffassung. Nach ihren Befunden an Hühnern sind Stärke und Zeitdauer der Fermenthemmung und Wiederanstieg der Aktivität praktisch gleich für lähmende (DFP, Triorthokresylphosphat, Mipafox) und nicht lähmende (Sarin, Tabun, Soman und Äthylsarin) Phosphorsäureester.

B. PROBLEMSTELLUNG

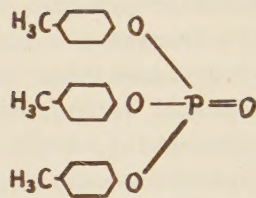
Die Auffassung über Giftwirkung und Wirkungsstärke von Trikresylphosphaten hat in letzter Zeit eine Wandlung erfahren. NEUMANN u. HENSCHLER (1957) fanden an Hühnern und Katzen, dass die Toxizität - entgegen der herkömmlichen Meinung - nicht dem Gehalt an Orthokresol parallel geht. Frühere Untersucher hatten nur die drei reinen Triester:



(I) Triorthokresylphosphat



(II) Trimetakresylphosphat



(III) Triparakresylphosphat

untersucht. Da von diesen nur Triorthokresylphosphat giftig wirkte, nahm man an, dass bei Trikresylphosphaten, die aus Kresolgemischen mit verschiedenem Anteil an Orthokresol hergestellt werden, für die Giftigkeit der Gehalt an Triorthokresylphosphat massgebend sei. Eingehende Untersuchungen von BAYER (1958) und HENSCHLER (1958) an isomeren Trikresylphosphatmischestern, die neben den drei Triestern (vergl. Formeln S.10) in Präparaten aus Gemischen der drei isomeren Kresole entstehen können, ergaben aber den zunächst überraschenden Befund, dass die drei Isomeren mit nur einem o-Kresylrest (Monoorthoester) am giftigsten sind. Es folgen die Diorthoester, die noch fünfmal wirksamer sind als reines Triorthokresylphosphat. Die Versuchstiere, Hühner und Katzen, entwickelten nach Vergiftung mit den verschiedenen o-Kresyl enthaltenden Isomeren (Formeln Nr. IV bis IX) auch qualitativ unterscheidbare Symptomenbilder: Nach Mischestern (o-m-p-, o-m-m-, o-p-p-, o-o-p- und o-o-m-Trikresylphosphat) und entsprechenden technischen Trikresylphosphaten treten durchweg spastische Paresen auf, während reines Triorthokresylphosphat fast stets schlaffe Lähmungen erzeugt.

Die histologische Untersuchung zeigte dann auch, dass beim Vergiftungstyp durch Mischester vorwiegend die langen Bahnen des Rückenmarks befallen werden, durch Triorthokresylphosphat aber in erster Linie die peripheren Nerven (N. ischiadicus). Diese Unterschiede im Vergiftungsbild lassen vermuten, dass die Isomeren verschiedene Angriffsorte im Nervensystem bevorzugen.

Diese Annahme eröffnet aber eine Möglichkeit zu weiteren Studien über den Mechanismus der Trikresylphosphatlähmung und zur Klärung der Beziehungen zwischen Cholinesterasehemmung und Lähmungswirkung. Die vorliegende Arbeit stellte sich daher die Aufgabe, den Einfluss von per os verabfolgten isomeren, orthokresolhaltigen Trikresylphosphatmischestern auf die Aktivität der Acetylcholin- und Pseudocholinesterase in verschiedenen Abschnitten des Nervensystems zu studieren.

C. TRIKRESYLPHOSPHATMISCHESTER UND PSEUDOCHOLIN- ESTERASEN IM NERVENSYSTEM DES HUHNS

Bekanntlich erkrankten nur einzelne Tierarten nach Trikresylphosphataufnahme mit den typischen Lähmungen. Bei der Wahl der Versuchstiere und geeigneter Versuchstechniken ergeben sich daher einige Schwierigkeiten, die einer eingehenden Besprechung bedürfen.

1. Methodik

a) Versuchstiere

Von den Tierspezies, die mit ähnlichen Vergiftungserscheinungen wie der Mensch reagieren, kommen für grössere Versuchsreihen nur Katzen und Hühner in Betracht. Katzen sind an sich besser geeignet, da bei ihnen das Symptomenbild am ehesten mit der menschlichen Vergiftung verglichen werden kann, wie kürzlich ausführlich diskutiert worden ist (HENSCHLER 1958). Die Cholinesteraseaktivitäten im Nervensystem schwanken aber sowohl bei normalen als auch bei mit Trikresylphosphat vergifteten Tieren beträchtlich (DAVISON 1953). Die Ermittlung verlässlicher Durchschnittswerte erfordert daher grössere Zahlen eines möglichst einheitlichen Tiermaterials. Aus diesem Grunde mussten bei dieser Arbeit Katzen von vornherein ausscheiden. Das Nervensystem des Huhns ist andererseits durch mehrere eingehendere Studien über die Lähmungswirkung von Trikresylphosphat (SMITH u. Mitarb. 1931, 1932; CAVANAGH 1953; FENTON 1955) gut bekannt. Da die Toxizitätsversuche von HENSCHLER (1958) und BAYER (1958) ebenfalls an Hühnern ausgeführt wurden, empfahl sich diese Tierart auch für die in dieser Arbeit gestellte Fragestellung. Um gute Vergleichsmöglichkeiten zu haben, arbeiteten wir daher mit Hühnern der gleichen Rasse und bezogen erbreine, rebhuhnfarbige Italiener, und zwar gleichaltrige Junghennen aus einem einheitlichen Brutansatz, die bei Versuchsbeginn 3 1/2 Monate alt waren. HENSCHLER (1958) und BAYER (1958) wiesen auf die Unbrauchbarkeit von Nagetieren hin, weil Ratten auf Trikresylphosphat in hohen Dosen ohne Krankheitszeichen reagieren. Mäuse und Kaninchen zeigen leichte Paresen ohne die für den Menschen typische Latenzzeit.

b) Versuchsprogramm

Die geprüften isomeren Mischester der Orthophosphorsäure und der drei Kresole, deren chemische Konstitution in den Formeln IV bis IX wiedergegeben ist, wurden den Hennen in jeweils drei Dosierungen verabfolgt (0,2 ml/kg, 0,1 ml/kg und 0,05 ml/kg). Meistens wurden pro Dosis vier Tiere verwendet. Die Werte von zehn unbehandelten Tieren dienten als Kontrollen.

Die Mischester, sämtlich ölig-flüssig, wurden in geeigneten Verdünnungen in Olivenöl den Tieren in Gelatinekapseln per os verabreicht. 24 Std nach der oralen Gabe erhielten die Hennen Pernokton (1-1,5 g/kg) in den Brustmuskel injiziert, nach eingetretener Betäubung wurden unter sorgfältiger Schonung des Nervengewebes Hirn und gesamtes Rückenmark von dorsal her herauspräpariert und beide Nn. ischiadici entnommen. Nach Abpräparieren anhängender Bindegewebsfetzen, Abspülen in Kochsalzlösung und Abtupfen auf Filterpapier wurden die Organe gewogen und mit geeigneten Volumina von Bikarbonat-Ringerlösung weiter verdünnt. Aufgearbeitet wurden das Gehirn ohne Kleinhirn, Cervical- und Lumbalmark an den Intumescenzen und die Ischiadici, soweit präparativ erreichbar. Die Nn. ischiadici mussten wegen der derben Konsistenz vor der Homogenisierung noch mit der Schere zerkleinert werden. Täglich wurden zwei oder vier Hühner aufgearbeitet, die Versuche liefen von Anfang Mai bis Ende Juni.

c) Bestimmung der Fermentaktivität

Die Bestimmung der Esteraseaktivitäten erfolgte mit der manometrischen Methode in Anlehnung an AMMON (1933). Alle Homogenate wurden auf die Aktivität von Acetylcholinesterase und Pseudocholinesterase geprüft. Als Substrate dienten Acetylcholinperchlorat und Butyrylcholinperchlorat (0,015 m bzw. 0,03 m in Bikarbonat-Ringerlösung, jeweils 2 ml im Haupttrog). Im Seitenarm 0,5 ml der Verdünnungen von Homogenaten der Teile des Nervensystems. In der Gasphase 95 % N₂ und 5 % CO₂, Reaktionstemperatur 38°. Die Ablesung erfolgte alle 10 min, für die vergleichende Auswertung wurden die 60 min-Werte zugrunde gelegt.

Die Bikarbonat-Ringerlösung besass folgende Zusammensetzung:

NaCl: $1,15 \cdot 10^{-1} \text{ m}$; NaHCO₃: $3,36 \cdot 10^{-2} \text{ m}$; KCl: $2,40 \cdot 10^{-3} \text{ m}$;
CaCl₂: $1,20 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ (AUGUSTINSSON 1948).

d) Geprüfte Phosphorsäureester

Die Substanzen sind die gleichen wie in den Versuchen von HENSCHLER (1958) und BAYER (1958). Sie sind aus chemisch reinen Kresolen und Phosphoroxychlorid systematisch aufgebaut über die entsprechenden Monokresyl-Dichloride und Dikresyl-Monochloride ⁺).

⁺) Den Farbwerken HOECHST sei für die Überlassung der Präparate und die Durchführung der Analysen gedankt.

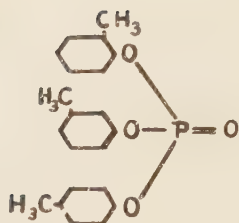
Die Kresolanteile der reinen Triorthoverbindung und der einzelnen Mischester sind mit den Siedepunkten (übernommen von BAYER) aus Tabelle 1 ersichtlich. Die Analysenwerte stimmen im Rahmen der Genauigkeit der Methode (STOLTENBERG 1955) mit der Theorie überein.

Tab. 1. Trikresylphosphatmischester mit Inhaltswerten an Kresolen und Phenol (chromatographisch im Verseiften bestimmt) und Siedebereichen

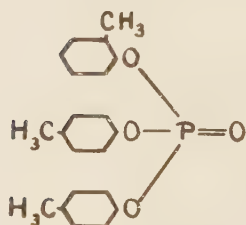
Formel	Bezeichnung	o-Kresol	m-Kresol	p-Kresol	Phenol	Kp. $\cdot 10^{-1}$
I	o-o-o-TKP	98 %	0-0,2 %	0,5 %	1,7 %	196-196,5 ⁰
IV	o-m-p-TKP	30,5 %	29,0 %	30,2 %	1,0 %	209,5-210 ⁰
V	o-p-p-TKP	28,8 %	0 %	64,0 %	2,0 %	208,5-209 ⁰
VI	o-m-m-TKP	31,6 %	64,5 %	1,2 %	2,5 %	204-204,5 ⁰
VII	o-o-p-TKP	63 %	0,3 %	31,0 %	4,0 %	204,5-205 ⁰
VIII	o-o-m-TKP	61 %	33,5 %	0,5 %	2,5 %	198,5-199 ⁰
IX	m-m-p-TKP	0,2 %	64,0 %	32,0 %	0,5 %	211-211,5 ⁰

Danach enthielten die bei der Synthese vorgelegten Kresole noch geringe Anteile an Isomeren und Phenol; die geringen Verunreinigungen der resultierenden Esterpräparate dürften jedoch ohne Bedeutung für die im folgenden beschriebenen Versuche sein.

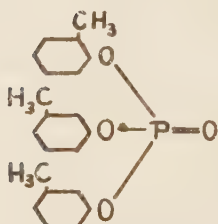
Die chemische Struktur der Mischester kann wie folgt formuliert werden:



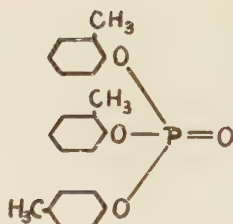
(IV) o-m-p-TKP



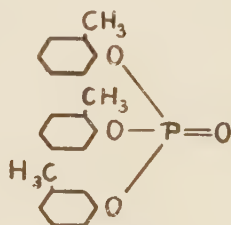
(V) o-p-p-TKP



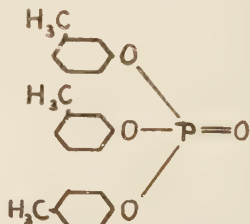
(VI) o-m-m-TKP



(VII) o-o-p-TKP



(VIII) o-o-m-TKP



(IX) m-m-p-TKP

2. Ergebnisse

Als Vergleichsmass der Aktivitäten von Cholinesterasen gilt für alle Versuche die pro Gewichtseinheit Gewebe in der Zeiteinheit entwickelte Menge Kohlensäure: $\text{mm}^3 \text{CO}_2 / \text{g} / \text{Std.}$

Zunächst fiel auf, dass von allen geprüften, orthokresolhaltigen Mischestern die Pseudochoolinesterase in allen Teilen des Nervensystems je nach Dosis mehr oder weniger stark gehemmt wurde; die Acetylcholinesterase blieb dagegen, wenn man die Aktivitäten mit denen der Kontrolltiere vergleicht, unbeeinflusst. In den Tabellen 2 bis 5 sind

Tab. 2. Pseudochoolinesteraseaktivitäten im H i r n von Hühnern nach Vergiftung mit isomeren Trikresylphosphaten

Substanz	Dosis ml/kg	Anzahl Tiere	$\text{mm}^3 \text{CO}_2/\text{g/Std.}$	% der Norm	Signifikanz der Differenz
o-m-p-TKP	0,2	4	469 $\pm$ 90	25,9	$p = 0,058$ $p < 0,01$ $p < 0,01$ +)
	0,1	4	658 $\pm$ 21	36,4	
	0,05	4	1072 $\pm$ 65,5	59,2	
o-p-p-TKP	0,2	2	773 $\pm$ 151	42,8	$p = 0,07$ $p < 0,01$ +)
	0,1	4	1270 $\pm$ 90	70,3	
o-m-m-TKP	0,2	2	(706 $\pm$ 25,7)	(39,1)	$p = 0,54$ $p = 0,025$ $p < 0,01$ +)
	0,1	4	642 $\pm$ 92	35,5	
	0,05	4	1017 $\pm$ 100	56,3	
o-o-p-TKP	0,2	2	572 $\pm$ 92	31,7	$p = 0,17$ $p = 0,015$ $p < 0,01$ +)
	0,1	4	751 $\pm$ 54	41,6	
	0,05	8	1022 $\pm$ 74	56,6	
o-o-m-TKP	0,2	2	631 $\pm$ 84	34,9	$p = 0,31$ $p < 0,01$ $p < 0,01$ +)
	0,1	4	742 $\pm$ 60	41,1	
	0,05	4	1208 $\pm$ 52	66,9	
o-o-o-TKP	0,2	2	162 $\pm$ 14	9,0	$p < 0,01$ $p < 0,01$ $p < 0,01$ +)
	0,1	4	920 $\pm$ 40	50,9	
	0,05	4	1241 $\pm$ 66,5	68,7	
m-m-p-TKP	2,0	4	2037 $\pm$ 107	113	
Normaltiere		9	1806 $\pm$ 37		

+) = Differenz zu den Normalwerten

daher nur die Resultate der Pseudocholinesterase-Aktivitätsbestimmung aufgeführt, und zwar nach Organgebieten (Hirn, Cervicalmark, Lumbalmark und N. ischiadicus) aufgeschlüsselt.

Tab. 3. Pseudocholinesteraseaktivitäten im C e r v i c a l -
m a r k von Hühnern nach Vergiftung mit isomeren
Triresylphosphaten

Substanz	Dosis ml/kg	Anzahl Tiere	mm ³ CO ₂ /g/Std	% der Norm	Signifikanz der Differenz
o-m-p-TKP	0,2	4	249 ± 86	15,6	p = 0,38 p < 0,01 p < 0,01 +)
	0,1	4	353 ± 41	22,2	
	0,05	4	852 ± 64,5	53,3	
o-p-p-TKP	0,2	2	567 ± 259	36,9	p = 0,11 p < 0,01 +)
	0,1	4	1133 ± 56	71,2	
o-m-m-TKP	0,2	2	(418 ± 78)	(26,3)	p = 0,58 p < 0,01 p < 0,01 +)
	0,1	4	352 ± 71	22,1	
	0,05	4	1017 ± 100	50,8	
o-o-p-TKP	0,2	2	318 ± 88	19,9	p = 0,17 p = 0,062 p < 0,01 +)
	0,1	4	444 ± 57	27,9	
	0,05	8	614 ± 56	38,6	
o-o-m-TKP	0,2	2	588 ± 155	35,1	p = 0,62 p < 0,01 p < 0,01 +)
	0,1	4	504 ± 60	31,7	
	0,05	4	838 ± 51,5	52,7	
o-o-o-TKP	0,2	2	0 ± 0	0	p = 0,046 p < 0,01 +)
	0,1	4	610 ± 68	39,4	
	0,05	4	930 ± 99	58,4	
m-m-p-TKP	2,0	4	1617 ± 236	101,5	
Normaltiere		9	1591 ± 129		

+) = Differenz zu den Normalwerten

Aufgeführt sind die Durchschnittswerte in $\text{mm}^3\text{CO}_2/\text{g}/\text{Std}$ aus den Einzelbestimmungen einer gleichen Dosierung mit Angabe des Fehlers am Mittelwert, der nach der Formel

$$\varepsilon = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}} \quad \begin{array}{l} (n = \text{Zahl der Einzelbeobachtungen} \\ d = \text{Differenz der Einzelbeobach-} \\ \text{tungen vom Mittelwert}) \end{array}$$

berechnet ist.

Tab. 4. Pseudocholinesteraseaktivitäten im L u m b a l m a r k von Hühnern nach Vergiftung mit isomeren Trikresylphosphaten

Substanz	Dosis ml/kg	Anzahl Tiere	$\text{mm}^3\text{CO}_2/\text{g}/\text{Std}$	% der Norm	Signifikanz der Differenz
o-m-p-TKP	0,2	4	302 ± 102	17,8	$p = 0,17$ $p < 0,01$ $p < 0,01$ +)
	0,1	4	484 ± 54	27,6	
	0,05	4	914 ± 89	52,1	
o-p-p-TKP	0,2	2	770 ± 102	43,9	$p = 0,12$ $p < 0,01$ +)
	0,1	4	1216 ± 95	69,4	
o-m-m-TKP	0,2	2	$(512 \pm 9,4)$	(29,2)	$p = 0,024$ $p < 0,01$ +)
	0,1	4	505 ± 61	28,8	
	0,05	4	897 ± 124	51,2	
o-o-p-TKP	0,2	2	374 ± 81	21,3	$p = 0,15$ $p < 0,01$ $p < 0,01$ +)
	0,1	4	528 ± 26	30,1	
	0,05	8	696 ± 53	39,7	
o-o-m-TKP	0,2	2	352 ± 119	20,1	$p = 0,265$ $p < 0,01$ $p < 0,01$
	0,1	4	514 ± 33	29,3	
	0,05	4	$909 \pm 60,5$	51,9	
o-o-o-TKP	0,2	2	0 ± 0	0	$p = 0,012$ $p = 0,022$ +)
	0,1	4	$466 \pm 84,2$	26,5	
	0,05	4	1172 ± 180	66,8	
m-m-p-TKP	2,0	4	1887 ± 137	107,5	
Normaltiere		10	1753 ± 130		

+) = Differenz zu den Normalwerten

Zehn Hühner, die kein Trikresylphosphat erhalten hatten, wurden in gleicher Weise wie die vergifteten aufgearbeitet; die Werte der Cholinesteraseaktivitäten galten als Norm und dienten bei der Berechnung der prozentualen Hemmung durch Trikresylphosphate als Bezugswerte.

Tab. 5. Pseudocholinesteraseaktivitäten im N. i s c h i a - d i c u s von Hühnern nach Vergiftung mit isomeren Trikresylphosphaten

Substanz	Dosis ml/kg	Anzahl Tiere	$\text{mm}^3\text{CO}_2/\text{g/Std}$	% der Norm	Signifikanz der Differenz
o-m-p-TKP	0,2	4	12 $\pm$ 12	12	$p = 0,026$ $p = 0,14$ $p = 0,017$ +)
	0,1	4	90 $\pm$ 25	18,8	
	0,05	4	217 $\pm$ 69,5	43,5	
o-p-p-TKP	0,2	2	121 $\pm$ 42	25,2	$p = 0,068$ $p = 0,014$ +)
	0,1	4	265 $\pm$ 40	55,3	
o-m-m-TKP	0,2	2	(16 $\pm$ 16,4)	(3,3)	$p = 0,79$ $p = 0,48$ $p < 0,01$ +)
	0,1	4	140 $\pm$ 12,5	29,2	
	0,05	4	172 $\pm$ 41	55,9	
o-o-p-TKP	0,2	2	132 $\pm$ 12	27,5	$p = 0,26$ $p = 0,059$ $p < 0,01$ +)
	0,1	4	103 $\pm$ 18	21,5	
	0,05	5	158 $\pm$ 16	33,0	
o-o-m-TKP	0,2	2	148 $\pm$ 28	30,9	$p = 0,71$ $p = 0,21$ $p = 0,056$ +)
	0,1	4	162 $\pm$ 21	33,8	
	0,05	4	273 $\pm$ 75	57,0	
o-o-o-TKP	0,2	2	0 $\pm$ 0	0	$p = 0,026$ $p < 0,01$ +)
	0,1	4	149 $\pm$ 21	31,1	
	0,05	4	252 $\pm$ 27	52,6	
m-m-p-TKP	2,0	4	290 $\pm$ 37	61	
Normaltiere		10	479 $\pm$ 62		

+) = Differenz zu den Normalwerten

Die Grösse der Abweichungen vom Mittelwert einer Beobachtungsreihe bestimmt bekanntlich die Zuverlässigkeit eines Versuchs. Mit Methoden der Statistik kann die Wahrscheinlichkeit, ob Unterschiede zweier oder mehrerer Reihen zufällig oder tatsächlich sind, ermittelt werden. Für die in dieser Arbeit gefundenen Mittelwerte (M) ist die Wahrscheinlichkeit p mit Hilfe der Formel

$$\frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\epsilon_1^2 + \epsilon_2^2}}$$

und einer Tabelle von FISHER (bei BURN 1937) berechnet, jeweils für Differenzen zwischen benachbarten Dosierungen bzw. zwischen den Werten der geringsten Dosis und Normaltieren; dies ist in den letzten Spalten der Tabellen 2 bis 5 entsprechend deutlich gemacht.

Nimmt man, wie meist in der Biologie gebräuchlich, als Grenze der Signifikanz 95 % Wahrscheinlichkeit ($p = 0,05$), so sind in unserem Versuch die meisten Differenzen von Mittelwerten benachbarter Dosierungen statistisch signifikant ($p < 0,05$). Ausnahmen ($p > 0,05$) treten meist dort auf, wo nur zwei Tiere pro Dosis verwendet wurden. Das war dann der Fall, wenn die Dosis-Wirkungsbeziehung anhand der benachbarten Werte hinreichend gesichert erschien; das kostbare Tiermaterial musste so eingeteilt werden, dass möglichst alle Stoffe in drei Dosierungen geprüft werden konnten.

Einen besseren Überblick als die Tabellen gibt eine Darstellung der Fermentaktivitäten (als % der Norm) in Kurven, wie sie in den Abbildungen 1 bis 4 versucht wurde. Man erkennt, dass der Grad der Pseudocholinesterasehemmung - wie erwartet - bei allen Stoffen mit

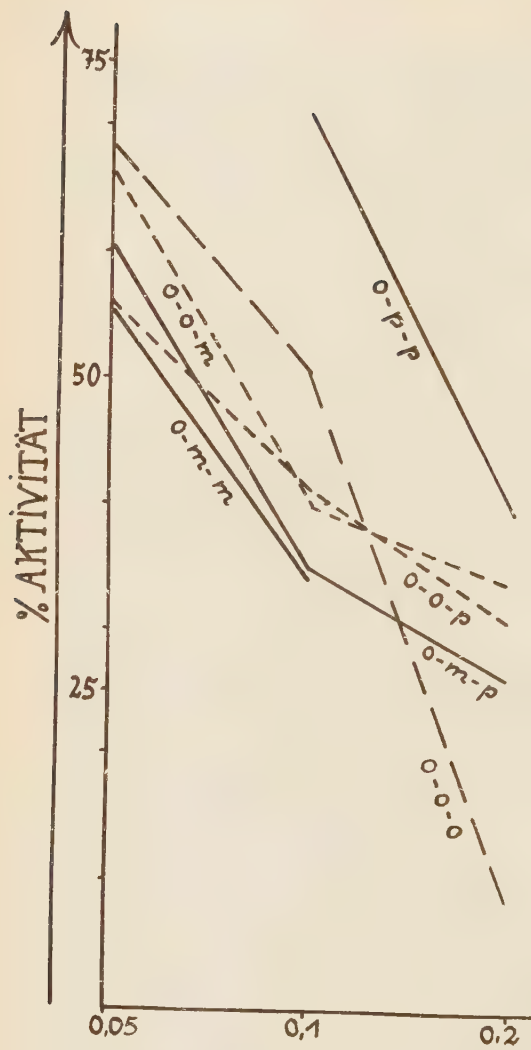


Abb. 1. Hirn

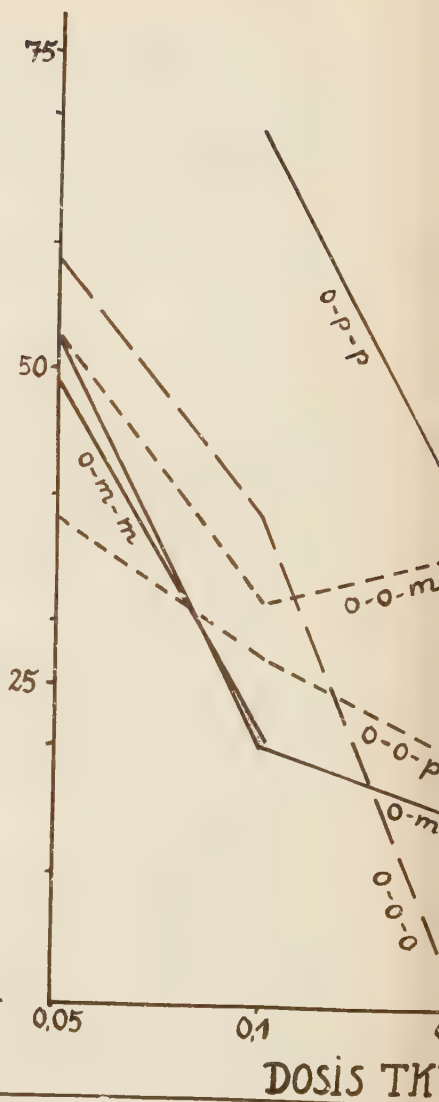


Abb. 2. Cervicalmark

Abb. 1 - 4. Pseudocholinesterasehemmung im Nervensystem des Huh

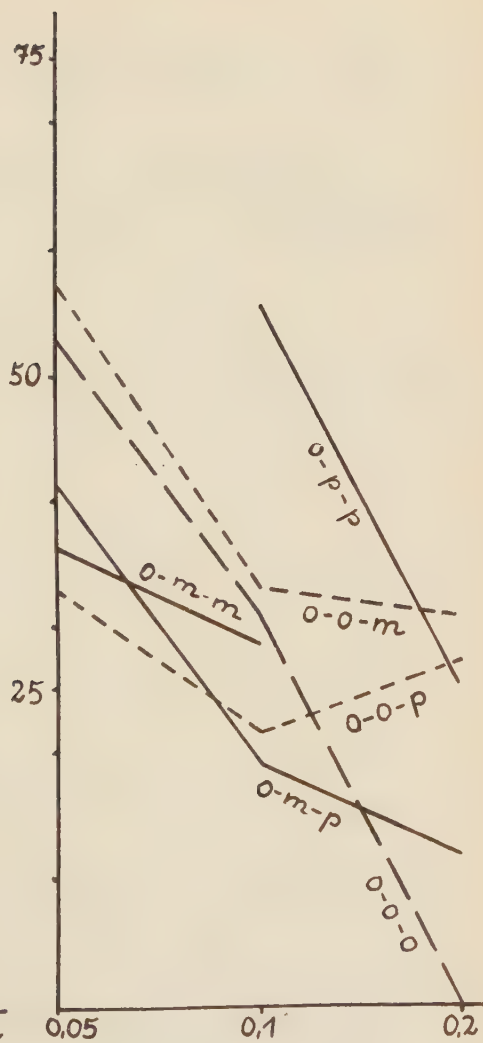
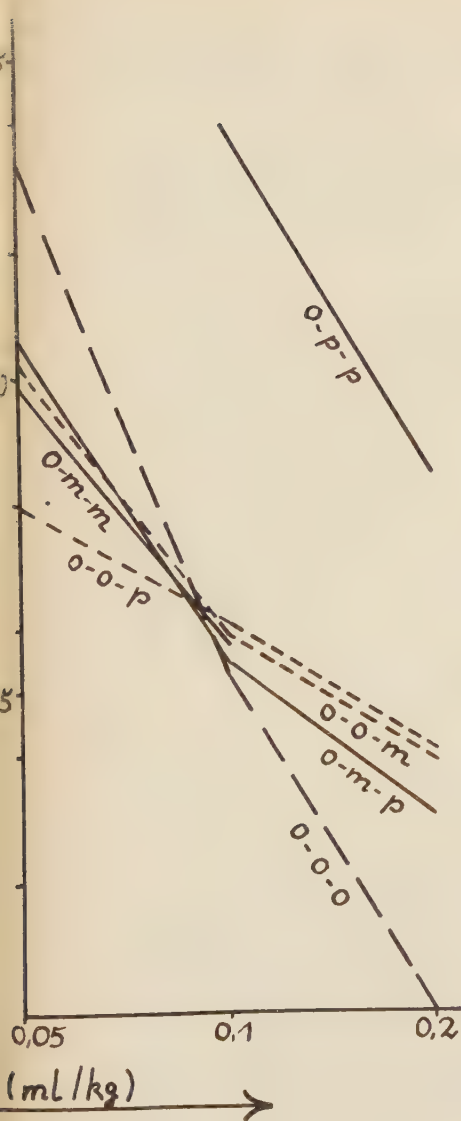


Abb. 3. Lumbalmark

Abb. 4. N. ischiadicus

in vivo nach abgestuften Dosen isomerer Triresylphosphatmischester

der Höhe der Dosierung zunimmt, von wenigen Ausnahmen abgesehen, auf die noch einzugehen sein wird.

Der von Orthokresol freie und ungiftige Mischester m-m-p-Trikresylphosphat bewirkte erwartungsgemäss selbst in der hohen Dosierung von 2,0 ml/kg keine Hemmung der Pseudocholinesterase.

Der Ester o-p-p-Trikresylphosphat hebt sich deutlich von allen anderen Stoffen ab, er ist durchschnittlich weniger als halb so wirksam wie diese. Daher ist die niedere Dosierung (0,05 ml/kg) hier auch weggelassen worden.

In der Schar der übrigen Kurven nimmt Triorthokresylphosphat (o-o-o-TKP) eine Sonderstellung ein: Die Dosis-Wirkungskurve verläuft im Gehirn, Cervical- und Lumbalmark - hier am deutlichsten - sowie im N. ischiadicus weitaus steiler als die der übrigen Ester. Bei der höchsten Dosis (0,2 ml/kg) ist die Aktivität in Rückenmark und Nerv sogar auf Null abgesunken.

Die Lage der restlichen Kurven zueinander lässt beim ersten Überblick kein System erkennen. Einzelne Ester bewirken aber bei der hohen Dosis von 0,2 ml/kg geringere Hemmung als nach der niedrigeren von 0,1 ml/kg, so im Cervicalmark o-o-m-Trikresylphosphat und im N. ischiadicus o-o-p-Trikresylphosphat. Dies dürfte darauf beruhen, dass in den meisten Fällen bei 0,2 ml/kg nur zwei Tiere eingesetzt werden konnten; wie schon erwähnt, stand für die gesamte Untersuchung nur eine begrenzte Anzahl von Hühnern zur Verfügung. Ein Vergleich der Tabellen 2 bis 5 zeigt denn auch, dass in den Fällen, wo vier oder acht Tiere verwendet wurden, die Durchschnittswerte der Erwartung entspre-

chen; die Differenzen sind hier auch signifikant oder an der Grenze der Signifikanz.

Die Werte für o-m-m-Trikresylphosphat bei 0,2 ml/kg waren aus versuchstechnischen Gründen (Versagen des Thermobarometers in der Warburg-Apparatur) nicht zu verwerten und sind daher in den Zeichnungen weggelassen, in den Tabellen geklammert.

Ein Vergleich der Wirkungsstärken innerhalb der einzelnen Abschnitte des Nervensystems lässt erkennen, dass die Aktivität im Gehirn von allen Estern weniger stark gehemmt wird als im Rückenmark und Nerv. Im N. ischiadicus hemmt Triorthokresylphosphat am stärksten. Für die Mischester sind keine Unterschiede im Cervicalmark, Lumbalmark und N. ischiadicus erkennbar.

D. DISKUSSION

Die Versuche zeigen, dass alle orthokresolhaltigen Mischester die Pseudocholinesterase in vivo hemmen, die Acetylcholinesterase dagegen bleibt in allen Teilen des Nervensystems unbeeinflusst. Bezüglich Triorthokresylphosphat o-o-o-TKP stimmen damit unsere Befunde mit denen anderer Autoren überein, die bei Hühnern durch diesen Ester keine Hemmung der Acetylcholinesterase fanden. Das Gleiche gilt also auch für die in Bezug auf die Neurotoxizität wirkungsstär-

keren o-kresolhaltigen Mischester (o-m-p-, o-p-p-, o-m-m-, o-o-p- und o-o-m-Trikresylphosphat). An Ratten hemmt die Triorthoverbindung (o-o-o-Trikresylphosphat) aber auch die Acetylcholinesterase in Erythrocyten und im Gehirn (COURSEY, DUNLAP u. HINE 1957). Zwar entwickeln Ratten nach Trikresylphosphataufnahme keine typischen Lähmungen durch Demyelinisierung (SMITH u. Mitarb. 1932); damit ist aber das verschiedene Verhalten der Acetylcholinesterase nicht erklärt. Zunächst bleibt nur die Annahme, dass die Acetylcholinesterase bei verschiedenen Tierarten unterschiedliche Eigenschaften und möglicherweise differente Substratspezifität besitzt, oder dass das Ferment nicht einheitlich ist, sondern aus mehreren Komponenten besteht, von denen nur eine oder ein Teil von o-o-o-Trikresylphosphat gehemmt werden. Obwohl NACHMANSON (1955) viele Befunde anführt, die für eine Beteiligung der Acetylcholinesterase bei der Fortleitung von Impulsen im Nerven sprechen, ist die natürliche Funktion des Ferments im Zentralnervensystem nicht sicher bekannt. Die Versuche von COURSEY, DUNLAP u. HINE sowie unsere Befunde schliessen jedenfalls einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Hemmung der Acetylcholinesterase und Demyelinisierung aus.

Orthokresolhaltige Trikresylphosphate hemmen die Pseudocholinesterase des Nervensystems in verschieden starkem Masse. Dabei bestehen weniger graduelle Unterschiede, vielmehr sind, wie die Darstellung in den Abbildungen 1 bis 4 zeigt, die Dosis-Wirkungskurven verschieden steil für o-o-o-Trikresylphosphat auf der einen, für alle Mischester auf der anderen Seite. HENSCHLER (1958) und BAYER (1958) fanden auch prinzipielle Unter-

schiede im Vergiftungsbild bei Hühnern nach der Triorthoverbindung und den Mischestern. Diese - rein formale - Parallelität deutet auf einen Zusammenhang zwischen Pseudocholinesterasehemmung und Lähmungswirkung, eine nähere Charakterisierung oder Zuordnung einzelner Estertypen auf bestimmte Eigenheiten der Vergiftung ist jedoch aufgrund der bisherigen Kenntnisse nicht möglich. Vieles spricht aber für die Annahme, dass bei der üblichen Versuchsanordnung zur Prüfung auf Pseudocholinesteraseaktivität an der Butyrylcholinspaltung nicht ein einheitliches Ferment, sondern ein Komplex von Enzymen beteiligt ist, die im Nervensystem normalerweise ganz verschiedene Funktionen ausüben.

Gewisse Anhaltspunkte dafür bieten neuere Untersuchungen von AUGUSTINSSON (1958), der die Esterasen des Blutes elektrophoretisch auftrennte. Hinter der "Pseudocholinesterase" verbergen sich danach eine ganze Reihe, ihrer Spezifität nach gut differenzierbare Enzyme; der Anteil an einzelnen dieser Fraktionen schwankt von Tierart zu Tierart in weiten Bereichen. Die Cholinesterasen im Nervensystem des Huhnes unterscheiden sich von denen anderer Tierarten in Bezug auf die Hemmung durch spezifische Inhibitoren grundsätzlich (FERRARI 1957).

Wenn das butyrylcholinspaltende Prinzip im Nervensystem des Huhns sich aus mehreren Anteilen (Fermenten) zusammensetzt, so wäre der unterschiedlich steile Verlauf der Dosis-Wirkungskurven in unseren Versuchen damit erklärbar, dass nicht alle Fermente von Trikresylphosphaten gehemmt werden und dass evtl. die verschiedenen Estertypen bezüglich der Hemmung einzelne Fraktionen bevorzugen. Damit wäre auch die

Sonderstellung des Esters o-p-p-Trikresylphosphat, der bei gleicher Toxizität wesentlich schwächer hemmt als die übrigen Mischester, durchaus motivierbar. Doch sind die Esterasen des Zentralnervensystems, insbesondere die "Pseudocholinesterase", noch nicht näher differenziert worden. Moderne Verfahren der Fermenttrennung wie Elektrophorese und Chromatographie könnten hier eine Klärung und evtl. Bestätigung der oben aufgezeigten Hypothese bringen. Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde zeigen jedenfalls einen Weg, dem Verständnis des Mechanismus der Lähmung durch Arylphosphate näherzukommen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Trikresylphosphat erzeugt Lähmungen durch Demyelinisierung in bestimmten Bahnen des Rückenmarks und in motorischen peripheren Nerven. Als Ursache ist die Hemmung der Pseudocholinesterase diskutiert worden, der man eine wichtige Rolle im Stoffwechsel des Myelins zuschrieb. Die Pseudocholinesterase des Nervensystems wird jedoch durch eine grosse Zahl von Phosphorsäureestern gleichermaßen gehemmt, von denen nur drei demyelinisieren.

Nach neueren Untersuchungen besitzen isomere Trikresylphosphate verschieden starke Lähmungswirkung: Die drei Ester mit einem o-Kresylrest (Monoorthoester) sind doppelt so wirksam als die beiden mit zwei solchen Resten (Diorthoester) und zehnfach stärker als die Triorthoerbindung. Isomere mit verschiedenen Kresylresten erzeugen vorwiegend spastische Paresen, während der einheitlich aufgebaute Ester Triorthokresylphosphat (o-o-o-TKP) zu schlaffen Lähmungen führt.

Zur Klärung der Frage, ob die unterschiedlichen Vergiftungsbilder durch verschiedene Verteilung der Ester im Nervensystem, d. h. durch differente Angriffspunkte bedingt sind oder durch Hemmung verschiedener Fermente, wurde in dieser Arbeit der Einfluss der sechs orthokresolhaltigen isomeren Trikresylphosphate auf die Cholinesterasen des zentralen und peripheren Nervensystems in vivo untersucht. Hühner von 14 bis 20 Wochen (insgesamt 76 Tiere) wurden mit drei geometrisch abgestuften Dosen (0,05; 0,1 und 0,2 ml/kg) der Ester gefüttert. Nach 24 Std wurden in Pernoktonarkose Gehirn, Cervical- und Lumbalmark sowie die

Nervi ischiadici entnommen, homogenisiert und die Aktivität der Acetylcholinesterase (mit Acetylcholinperchlorat) und der Pseudocholinesterase (mit Butyrylcholinperchlorat) in der Warburg-Apparatur geprüft.

Alle orthokresolhaltigen Trikresylphosphate (TKP) hemmen die Pseudocholinesterase, die Acetylcholinesterase bleibt unbeeinflusst. Der Ester o-p-p-TKP besitzt die geringste Hemmung und nimmt eine Ausnahmestellung ein. Zwischen den übrigen Mischestern und der Triorthoverbindung besteht in allen geprüften Teilen des Nervensystems ein prinzipieller Unterschied. Nach 0,2 ml/kg o-o-o-TKP ist die Pseudocholinesteraseaktivität im N. ischiadicus und im Rückenmark auf Null, im Hirn auf 10 % abgefallen, nach 0,05 ml/kg auf durchschnittlich 55 % in allen Teilen des Nervensystems. Für die Mischester (ausser o-p-p-TKP) sind dagegen nach 0,2 ml/kg im Durchschnitt noch 20 bis 30 % der Aktivität nachweisbar, nach 0,05 ml/kg dagegen 30 bis 55 %. Bei 0,1 ml/kg ist die Hemmwirkung für die Mischester und o-o-o-TKP ungefähr gleich. Die Dosis-Wirkungskurven für o-o-o-TKP verlaufen also deutlich steiler als die der Mischester. Der von o-Kresol freie Mischester m-m-p-TKP beeinflusst selbst nach zehnfach höheren Dosen (2,0 ml/kg) die Cholinesterasen nicht.

Die Ergebnisse bringen keine eindeutige Klärung der gestellten Frage. Mehrere, in der Diskussion näher erläuterte Anhaltspunkte sprechen aber dafür, dass die "Pseudocholinesterase" des Nervensystems kein einheitliches Enzym ist, sondern aus mehreren Fraktionen besteht, die unterschiedlich stark von den einzelnen Estern gehemmt werden. Wahrscheinlich findet sich unter den an der Butyrylcholinspaltung in vitro

beteiligten Anteilen das für die Lähmung durch Trikresylphosphate verantwortliche Prinzip. Die Parallelität zwischen Lähmungstypus und Toxizität der zwei Typen isomerer Trikresylphosphate fände so eine Erklärung.

Herrn Professor Dr. Dr. W. N e u m a n n gestatte ich mir für die an seinem Institut gebotene Arbeitsmöglichkeit, sein immer verständnisvolles Entgegenkommen sowie die freundliche Übernahme des Korreferates meinen aufrichtigen Dank zu sagen.

Herrn Privatdozenten Dr. D. H e n s c h l e r danke ich für die Überlassung des Themas, die stete persönliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung dieser Arbeit und die Übernahme des Referates herzlich.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- AMMON, R.: Pflüg. Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1933)
- AUGUSTINSSON, K. - B.: Acta physiol. scand. 15, Suppl. 52 (1948)
- AUGUSTINSSON, K. - B.: Nature (Lond.) 181, 1786 (1958)
- AUSTIN, L., and D. R. DAVIES: Brit. J. Pharmacol. 9, 145 (1954)
- BARNES, J. M., and F. A. DENZ: J. Path. Bact. 65, 597 (1953)
- BAYER, H. H.: Med. Inaug. Diss. Würzburg 1958
- BLOCH, H.: Helv. med. Acta, 8 Suppl. 7, 15 (1941)
- BLOCH, H.: Helv. chim. Acta 25, 733 (1942)
- BLOCH, H. u. A. HOTTINGER: Z. Vitaminforsch. 13, 9 (1943)
- BURN, J. H.: Biolog. Auswertungsmethoden Springer-Verlag, Berlin 1937
- CAVANAGH, J. B.: J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 17, 163 (1954)
- COURSEY, M.M., M. K. DUNLAP, and C. H. HINE: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 96, 673 (1957)
- DAVISON, A. N.: Brit. J. Pharmacol. 8, 212 (1953)
- EARL, C. J., and R. H. S. THOMPSON: Brit. J. Pharmacol. 7, 261 (1952)
- EARL, C. J., and R. H. S. THOMPSON: Brit. J. Pharmacol. 7, 685 (1952)
- FENTON, J. C. B.: J. Path. Bact. 69, 181 (1955)
- FERRARI, W.: Nature (Lond.) 180, 144 (1957)

- HENSCHLER, D.: Klin. Wschr. 1958, 684
- HOTTINGER, A. u. H. BLOCH: Helv. chim. Acta 26, 142 (1943)
- MENDEL, B., and H. RUDNEY: Science 100, 499 (1944)
- MENDEL, B., and D. K. MYERS: Nature (Lond.) 170, 928 (1952)
- NACHMANSOHN, D.: Ergebn. Physiol. 48, 575 (1955)
- NEUMANN, W. u. D. HENSCHLER: Naturwissenschaften 44, 329
- POTTER, W. R.,
and C. A. ELVEJHEM: J. biol. Chem. 114, 495 (1936)
- SMITH, M. J., and R. D. LILLIE: Arch. Neurol. Psychiat.
26, 976 (1931)
- SMITH, M. J., E. W. ENGEL,
and E. F. STOHLMAN: Publ. Hlth Rep. 47, 1 (1932)
- STOLTENBERG, H.: Zschr. analyt. Chemie
146, 181 (1955)

LEBENS LAUF

Am 23. August 1931 wurde ich als Tochter des Rechtsanwalts u. Notars Dr. Paul Erb und seiner Ehefrau Emmy, geb. Müller in Bad-Salzungen/Thür. geboren. Im Anschluss an die Volksschule besuchte ich von Ostern 1942 bis zum Frühjahr 1945 die Oberschule in Vacha/Rhön und vom Herbst 1945 bis 1950 die Oberschule in Bad-Salzungen. Dort legte ich im Sommer 1950 die Reifeprüfung ab. Im Herbst 1950 nahm ich das Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena auf und legte im Sommer 1952 nach vier vorklinischen Semestern die zahnärztliche Vorprüfung ab. Das klinische Studium führte ich ebenfalls in Jena durch und beendete es im September 1955 mit dem Zahnmedizinischen Staatsexamen. Von November 1955 bis Oktober 1957 war ich an der Städtischen Poliklinik in Apolda/Thür. als Zahnärztin tätig. Nachdem ich im Oktober 1957 zusammen mit meinen Eltern und meinem Bruder die DDR verlassen hatte, arbeitete ich von November 1957 bis Februar 1958 als Zahnärztin in einer Kassen- und Knappschaftspraxis in Duisburg. Von Anfang Mai bis Ende Juni 1958 führte ich am Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg den experimentellen Teil meiner Dissertation durch. Dann war ich von November 1958 bis April 1959 als Zahnärztin in Aschaffenburg tätig. Seit April 1959 bin ich Gast des Pharmakologischen Instituts der Universität Würzburg.

Ich versichere ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und ausser der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, dass ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Ir.-Susi Erb

